Tuzov I.N., D. Sc. in Agr., Prof. of technology cattle breeding, Kuban State Agrarian University, tel. 89184151130.

Zelenkov P.I., D. Sc. in Agr., Prof. of private zootechnics, Don State Agrarian University, Persianovskiy, tel. 89525775123.

УДК: 615.326:552.52

Зуев Н.П., Буханов В.Д., Везенцев А.И., Нгуен Хоай Тьяу, Скворцов В.Н., Шапошников А.А., Панькова О.Н., Зуев С.Н., Соколовский П.В., Зуева Е.Н., Козубова Л. А.

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МОНТМОРИЛЛОНИТ СОДЕРЖАЩЕГО СОРБЕНТА И PH ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Ключевые слова: колибактериоз, определение чувствительности, *Escherichia coli*, питательные среды, энрофлоксацин, доксициклин, монтмориллонит содержащий сорбент, композиционные препараты, метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Резюме: На основании проведенных исследований установлена антибактериальная активность энрофлоксацина и его сочетаний с обогащённым монтмориллонит содержащим сорбентом по отношению к кишечной палочке. Результаты проведенных исследований резюмируют о высокой чувствительности кишечной палочки к комплексному препарату, сочетающему 1:1 энрофлоксацин с сорбентом, где концентрация каждого препарата составляет 0,063 мкг/мл бульона. Установлено, что сорбционная активность обогащённой монтмориллонит содержащей глины по отношению к органическим соединениям в кислой среде выше, чем в щелочной. Подобная роль влияния pH питательной среды и количества сорбента в ней также сказывается на понижении бактериостатического действия доксициклина. Предпосылками проявления снижения антибактериальной активности энрофлоксацина и доксициклина является повышенная диссоциация из монтмориллонит содержащего сорбента в питательную среду ионов алюминия, железа, магния, кальция, натрия, в силу чего с данными препаратами образовывались неактивные хелатные соединения [11]. Объяснением установленной повышенной потенцирующей эффективности препаратов, по-видимому, является процесс иммобилизации на их поверхности активных лигандов. Резюмируя выше приведенные материалы можно отметить, что создание новых препаратов расширяет возможности применения энтеросорбции в комплексном лечении животных, страдающих острыми кишечными заболеваниями инфекционной этиологии. Кроме того, рациональное использование композиционных антимикробных препаратов можно применить для дозированного введения лекарственных соединений при условии их обратной десорбции. Создание препаратов указанного направления связано, как с использованием селективных энтеросорбентов с заведомо известной химической природой их поверхности и размером пор, так и особенностями терапевтического действия в различных отделах желудочно-кишечного тракта с учётом pH химуса и необходимой концентрации сорбента. Придание энтеросорбентам специфических свойств путём иммобилизации на их поверхности лекарственных субстанций в виде активных лигандов, является перспективным направлением, позволяющим оптимизировать и минимизировать расход антибактериального средства и, в ряде случаев, повысить его удельную активность за счёт перехода от объемных концентраций к поверхностным. Решение сложившейся проблемы подобным образом снижает или даже устраняет негативное воздействие на организм химиотерапевтических субстанций.

Введение

Желудочно-кишечные болезни человека и животных были и остаются актуальной проблемой для современной медицины и ветеринарии. При этом в нозологической структуре алиментарных инфекций колибактериоз занимает одно из ведущих мест. Вариантная многофакторность данного заболевания делает его трудно контролируемым, в результате чего сельскохозяйственной отрасли наносятся колоссальные убытки от заболевания и падежа животных в пре- и постнатальные периоды развития [1, 2, 3, 4].

Большая вариабельность штаммов *Escherichia coli*, а также высокая степень изменчивости, затрудняют специфическую профилактику и лечение животных, больных колибактериозом. Применяемые антимикробные препараты (антибиотики, сульфаниламиды, нитрофураны) и другие терапевтические средства в большинстве своем малоэффективны и экологически опасны, в связи с образованием антибиотикоустойчивых штаммов и снижением общей реактивности организма животных. Наряду с этим они являются причиной аллергических состояний и часто приводят к развитию дисбактериоза [5, 6].

Терапевтические мероприятия, как правило, осуществляются по двум взаимодополняющим направлениям – введением в организм необходимого и полезного и выведением из организма излишнего и вредного. В большинстве случаев преобладает первое направление, но постепенно зреет понимание важности и необходимости второго, свидетельством чего является успешное развитие эфферентных методов в медицине. В связи с тем, что ухудшается общее экологическое состояние окружающей среды: возрастает воздействие промышленных и бытовых загрязнителей, пестицидов, гербицидов, нитратов, нитритов, стимуляторов роста, антибиотиков, других биохимически чужеродных субстанций, электромагнитных полей и т. д., организм человека и животных постоянно подвергается влиянию различных ксенобиотиков. Поэтому дополнительное введение еще одного лекарственного препарата может привести к отрицательным последствиям, вместо ожидаемых положительных результатов. В этой ситуации полезны методы эфферентной медицины, позволяющие корригировать состояние внутренней среды и снижать токсическую нагрузку на организм [7, 8].

Веществами, способными на своей поверхности адсорбировать патогенные микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности, являются энтеросорбенты, это облегчает поиск и разработку современной наукой лекарственных соединений, обладающих высокой эффективностью при лечении и профилактике колибактериоза и влияющих на патогенные микроорганизмы, независимо от их антигенного состава [9].

В настоящее время накоплен большой массив научно обоснованной информации по практическому использованию энтеросорбции. Кроме того, создание композиционных препаратов с использованием различных групп сорбентов расширило возможности применения энтеросорбции в комплексном лечении острых кишечных инфекций, поскольку энтеросорбенты являются средством с многогранной эффективностью, определяемой не только их симптоматическим (антидиарейным) и патогенетическим (дезинтоксикационным и др.), но и этиотропным действием, как в отношении патогенных бактерий, так и вирусов [10].

Однако многие зарегистрированные энтеросорбенты пока еще не нашли широкого применения в силу различных причин:

1) недостаточной информированности врачей о роли энтеросорбентов в лечении больных животных с инфекционной и неинфекционной патологией желудочно-кишечного тракта;

2) незнания достоинств и недостатков тех или иных сорбентов при конкретной болезни и фактически существующего, пока еще скептического, отношения врачей к энтеросорбции.

Поскольку в Российской Федерации и Вьетнаме имеются огромные залежи монтмориллонитовых глин, то целью нашей совместной работы явилось изучение чувствительности *Escherichia coli* к антибактериальным препаратам и их сочетаниям с различными концентрациями обогащённого монтмориллонит содержащего сорбента при различных значениях pH питательной среды.

Материал и методы исследований

Определение чувствительности *Escherichia coli* к энрофлоксацину и сочетанию энрофлоксацина с сорбентом проводили общепринятым методом двойных последовательных разведений препаратов в жидкой питательной среде. Разведение препаратов производили в мясопептон-

ном бульоне (МПБ). Каждый ряд разведений состоял из 9 пробирок, содержащих по 5 мл МПБ. В первом ряду пробирок концентрация энрофлоксацина в начальной пробирке составляла 4, в последней – 0,016 мкг/мл. Второй ряд разведений энрофлоксацина 1:1 с сорбентом содержал аналогичные концентрации каждого ингредиента. В третьем ряду разведений энрофлоксацина с сорбентом концентрация энрофлоксацина была такой же, как и в предыдущих рядах, а сорбента – составила: 2-3 пробирки – 4 мг/мл, а в последующих – 2 мг/мл.

В контроле использовали два ряда пробирок. Первый ряд разведений содержал только сорбент в концентрации от 4 до 0,016 мкг/мл. Во втором контрольном ряду был энрофлоксацин с сорбентом в концентрациях, аналогичных второму опытному ряду. В трёх опытных и первом контрольном рядах десятые пробирки содержали только МПБ.

После выполненных разведений в каждую пробирку (кроме второго контрольного ряда) вносили 0,1 мл суточной культуры *Escherichia coli* (500000 микробных клеток), что составило 100000 микробных клеток на 1 мл МПБ. Во второй контрольный ряд разведений культура кишечной палочки не вносилась, с целью проверки стерильности приготовленных разведений в МПБ.

В следующем эксперименте выяснение влияния концентрации обогащённого монтмориллонит содержащего сорбента и pH питательной среды на чувствительность *Escherichia coli* к энрофлоксацину и доксициклину осуществляли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера – Хинтон (МХА). Исследования проводили в одноразовых чашках Петри диаметром 5,5 см, три ряда по одиннадцать чашек. Предварительно в чашки Петри вносили: в первую (20 мг) и вторую (10 мг) каждого ряда – стерильные навески обогащенного монтмориллонит содержащего сорбента и по 1 мл стерильного изотоническиго раствор натрия хлорида, в последующие (с 3 по 10) – по 1 мл разведений стерильного сорбента в концентрациях с 500 до 3,91 мкг/мл в изотоническом растворе натрия хлорида. Для опыта было подготовлено три флакона по 110 мл МХА. После автоклавирования и охлаждения МХА до 45-42°С, производили установку уровней pH среды: в первом флаконе до 6, во втором – до 7, в третьем – до 8. Далее в эти среды вносили суточную культуру Escherichia coli, из расчёта 1 10^7 КОЕ (колониеобразующих единиц) в 1 мл МХА. Затем в каждую чашку приливали по 9 мл МХА и тщательно суспендировали с сорбентом. После уплотнения МХА на её поверхность помещали диски, содержащие энрофлоксацин (5 мкг фирмы Байер) и доксициклин (10 мкг ФГУН НИИЭМ им. Пастера, С.-Петербург). В контрольные чашки (одиннадцатые) каждого ряда вносили только 10 мл МХА, инфицированной *Escherichia coli*.

Пробирки и чашки с исследуемыми разведениями культивировали в течение 16-18 часов в термостате при температуре 37°С. После чего проводили учёт полученных результатов. С целью получения достоверных результатов опыты повторялись троекратно.

Оценку цидного действия монтмориллонит содержащего сорбента и его сочетания с энрофлоксацином, а также проявления сорбционной способности сорбента по отношению к Escherichia coli, производили методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [12] с использованием флуоресцентного зонда 5-карбоксифторесцеин диацетата (5-CARBOXYFLUORESCEIN DIACETATE, C4916 SIGMA-ALDRICH) [13]. Для исследования в стерильных условиях в пяти пробирках подготовили пробы следующего состава (в трех повторностях): проба I – 9 мл изотонического раствора натрия хлорида + 10,0 мкг энрофлоксацина, проба II – 9 мл изотонического раствора натрия хлорида + 20 мг сорбента, проба III – 9 мл изотонического раствора натрия хлорида + 10,0 мкг энрофлоксацина + 20 мг сорбента, проба IV – 9 мл изотонического раствора натрия хлорида, проба V – 9 мл МПБ. Затем в каждую пробирку внесли по 1 мл суточной культуры Escherichia coli, концентрация которой составляла 9x10^8 колониеобразующих единиц в 1 мл. Содержимое пробирок тщательно суспендировали. После этого все пять проб подвергли 24-часовой экспозиции в термостате при температуре 37 С.

Стоковые растворы флуоресцентного зонда готовили согласно инструкции производителя. Из стоковых растворов получали рабочий раствор, для этого 2 мкмоль 5-карбоксифторесцеин диацетата растворяли в 1,5 мл раствора хлорида натрия. К 100 мкл исследуемой пробы, находящейся в чашке Петри диаметром 35 мм, с центральным отверстием и покровным стеклом (SPL Lifesciences), добавляли 10 мкл флуоресцентного зонда и инкубировали при 37 С в течение 30 мин. После ис-

течения времени инкубации чашку Петри помещали на предметный столик конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus, сканирование образцов осуществляли при длине волны 488 нм. По результатам конфокальной лазерной сканирующей микроскопии определяли количество живых клеток в поле зрения микроскопа.

Определение концентрации кишечной палочки проводили с помощь прибора для определения мутности бактериальной суспензии Densi-La-Meter, принцип работы которого основан на оптической абсорбции суспензии с выдачей результата измерения в единицах по Мак-Фарланду.

Итоговые результаты были получены с помощью компьютерных программ вариационной статистики, с использованием непараметрического t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

На основании проведенных исследований установлена антибактериальная активность энрофлоксацина и его сочетаний с обогащённым монтмориллонит содержащим сорбентом по отношению к кишечной палочке (табл. 1).

Представленные в таблице 1 данные свидетельствуют о высокой чувствительности кишечной палочки к комплексному препарату сочетающему 1:1 энрофлоксацин с сорбентом, где концентрация каждого препарата составляет 0,063 мкг/мл бульона. Минимальная ингибирующая концентрация энрофлоксацина, по сравнению с указанной композицией, в отношении эшерихий оказалась ниже (0,125 мкг/мл). Это сочетание, как показал эксперимент, помимо общеизвестной детоксикационной функции энтеросорбента (активное поглощение токсинов снижает как местный, так и общий токсикоз, уменьшает метаболическую нагрузку на органы детоксикации: печень, почки, иммунную систему), приводит к синергетическому усилению бактериостатического эффекта. Также нельзя не обратить внимания на постепенное увеличение количества микробных клеток в жидкой питательной среде (с 7 по 9 пробирки), в которой содержание эн-

Таблица 1. Чувствительность *Escherichia coli* к энрофлоксацину и его сочетаниям с монтмориллонит содержащим сорбентом

Table 1. Sensitivity of Escherichia coli to Enrofloxacin and its combinations with montmorillonite-containing sorbent

№ п/п	Препарат	Концентрация сорбента, мкг/мл.									Контроль
		4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	
		Оптическая плотность в единицах по Мак-Фарланду, мг/мл									
1	Энрофлоксацин	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	+ 1,5	+ 1,9	+ 3,8	+ 5,0
2	Энрофлоксацин + Сорбент	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	+ 2,7	+ 4,1	+ 5,2
3	Энрофлоксацин + Сорбент		– 4	– 4	– 2	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2	+
			Показатели оптической мутности до культивирования								
			9,8	9,8	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	
			Показатели оптической мутности после культивирования								
			9,8	9,8	7,0	10,0	11,0	11,0	11,0	11,0	5,1
Контроль											
1	Сорбент	+ 4,7	+ 4,8	+ 4,7	+ 4,7	+ 4,7	+ 4,7	+ 5,0	+ 5,0	+ 4,8	+ 4,7
2	Энрофлоксацин + Сорбент	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	– 0	

Примечание: + наличие роста кишечной палочки; – отсутствие роста кишечной палочки.

рофлоксацина снижалось 2-кратными разведениями. Данный эффект не проявлялся в сочетании энрофлоксацина с сорбентом. При использовании энрофлоксацина с сорбентом количество микробных клеток (8-9 пробирки) нарастало более интенсивно, это даёт основание полагать, что энрофлоксацин частично связывается сорбентом.

Руководствуясь полученными результатами, можно вполне определённо сказать, что при сочетании энрофлоксацина с сорбентом в соответствующих концентрациях 2, 1, 0,5 мкг/мл и 4, 4, 2 мг/мл проявляется бактериостатическое действие композиционного препарата. Иначе выглядел механизм антимикробного действия изучаемого сочетания, если уровень сорбента повышался до 4-2 мг/мл питательной среды. Подтверждением сделанного вывода служат неизменившиеся показателями денсиламетра, как до – так и после культивирования исследуемого штамма в совокупности с вышеуказанными комбинациями препаратов.

В последующих сочетаниях, с более низкими концентрациями энрофлоксацина от 0,016 до 0,25 мкг/мл, но с постоянным уровнем сорбента (2 мг/мл), отмечался рост кишечной палочки с показателем оптической плотности по Мак-Фарланду на 1-2 единицы меньше, чем в контроле. Это говорит о том, что сорбент в высоких концентрациях не связывает полностью энрофлоксацин. Также можно предположить о наличии существующей непрочной иммобилизации энрофлоксацина сорбентом, путём образования на его поверхности специфических лигандов. В этом случае образовавшиеся лиганды достаточно легко десорбируются с поверхности сорбента, а энрофлоксацин попадает в жидкую питательную среду. В таком варианте: система сорбент-иммобилизованный фторхинолоновый препарат – обладает определенной буферной ёмкостью, то есть, работает как склад-депо, из которого по мере необходимости может выделяться определённое количество антибактериального препарата.

Помимо всего прочего иммобилизация антибактериальных комплексов на поверхности энтеросорбентов позволяет получать целый спектр новых комплексных препаратов, сочетающих в себе сорбционные свойства и качества, присущие противомикробным соединениям. Рациональное решение сложившейся проблемы подобным образом оптимизирует и минимизирует расход антибактериального средства и, в ряде случаев, повышает его удельную активность за счет перехода от объемных концентраций к поверхностным.

В бульоне контрольных пробирок, не содержащих исследуемых препаратов, наблюдался активный рост и размножение эшерихий, в которых концентрация микроорганизмов, согласно показаниям денсиламетра, колебалась в пределах 4,7-5,2 единиц. Идентичная концентрация кишечной палочки регистрировалась в контрольных пробирках с различным количеством исследуемого сорбента. Отсутствие роста микроорганизмов в пробирках второго контрольного ряда, содержащих 2-кратные разведения композиционного препарата, свидетельствует о проведении эксперимента в стерильных условиях.

Итоги исследований по выяснению влияния концентрации обогащённого монтмориллонит содержащего сорбента и pH питательной среды на чувствительность *Escherichia coli* к антибактериальным препаратам отличались достоверными данными (табл. 2).

Информация, изложенная в рассматриваемой таблице, в полной мере иллюстрирует механизм ингибирующего и синергетического эффекта исследуемых субстанций. В результате интеграции антибактериальных препаратов и обогащённого монтмориллонит содержащего сорбента в единую систему наблюдался эффект эмерджентности. Следовательно, существенно отличающиеся размеры зон задержки роста кишечной палочки в контрольных и опытных чашках Петри лежат в основе установленного факта.

Судя по величине диаметров образовавшихся зон в МХА контрольных чашек, проявившихся в результате бактериостатического действия энрофлоксацина и доксициклина, особого внимания заслуживает факт уровня pH питательной среды, не содержащей сорбента. Основываясь на количественном материале эксперимента, следует сделать вывод, что спектр подавления роста *Escherichia coli* у энрофлоксацина увеличивается по мере повышения pH (от 6 до 8) питательной среды, а у доксициклина – понижается.

Аналогичный механизм действия этих препаратов отмечался в опытных образцах МХА с 2-кратными серийными разведениями сорбента. Как установлено из прилагаемой таблицы, процесс сдерживания развития эшерихий, диффундирующим из дисков в МХА энрофлоксацином, зависит не только от pH питательной сре-

Таблица 2. Чувствительность *Escherichia coli* к сочетаниям энрофлоксацина и доксициклина с монтмориллонит содержащим сорбентом при различных pH и концентрациях сорбента в МХА

Table 2. Sensitivity of *Escherichia coli* to combinations of Enrofloxacin and Doxycycline with montmorillonite-containing sorbent under different pH and sorbent concentrations in the Mueller – Hinton agar conditions

№ п/п	Концентрация сорбента, мкг/мл	Зона задержки роста, мм					
		pH питательной среды 6		pH питательной среды 7		pH питательной среды 8	
		опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
		энрофлоксацин / доксициклин	энрофлоксацин / доксициклин	энрофлоксацин / доксициклин	энрофлоксацин / доксициклин	энрофлоксацин / доксициклин	энрофлоксацин / доксициклин
1	2000	8,2±0,04 / 8,4±0,04	12,8±0,004 / 10,0±0,004	11,2±0,21 / 8,0±0,04	16,0±0,13 / 10,2±0,004	13,1±0,08 / –	16,1±0,08 / 8,0±0,04
2	1000	9,1±0,08 / 10,1±0,13		12,5±0,08 / 8,6±0,04		14,1±0,08 / –	
3	500	10,1±0,08 / 12,2±0,04		13,1±0,04 / 9,2±0,17		15,0±0,13 / –	
4	250	10,1±0,08 / 9,7±0,21		16,0±0,13 / 9,2±0,04		16,1±0,04 / –	
5	125	10,1±0,08 / 11,3±0,13		16,0±0,13 / 10,0±0,00		16,1±0,04 / –	
6	62,50	12,6±0,08 / 12,0±0,04		16,2±0,17 / 10,0±0,17		16,1±0,04 / –	
7	31,25	12,2±0,13 / 12,3±0,08		16,1±0,04 / 10,3±0,17		16,2±0,13 / –	
8	15,63	12,8±0,21 / 13,1±0,04		16,6±0,13 / 10,0±0,00		16,2±0,13 / –	
9	7,81	13,0±0,42 / 11,4±0,33		17,0±0,42 / 10,0±0,17		16,5±0,13 / –	
10	3,91	13,1±0,21 / 12,0±0,84		17,0±0,84 / 10,1±0,04		16,8±0,25 / –	

Примечание: числитель - энрофлоксацин; знаменатель - доксициклин;
– отсутствие зоны задержки роста

ды, но и от концентрации сорбента в ней. Снижение размеров зон задержки роста кишечной палочки энрофлоксацином в кислой питательной среде (pH 6), по сравнению с контролем, регистрировалось при концентрациях сорбента от 2000 до 31,25 мкг/мл. Реализация подобных результатов фиксировалась в нейтральной (pH 7) и щелочной средах (pH 8), но с уровнем содержания сорбента в диапазоне от 2000 до 500 мкг/мл.

Руководствуясь полученными данными установлено, что сорбционная активность обогащённой монтмориллонит содержащей глины, по отношению к органическим соединениям, в кислой среде выше, чем в щелочной.

Подобная роль влияния pH питательной среды и количества сорбента в ней также сказывается на понижении бактериостатического действия доксициклина. Однако выявленная зависимость, наглядно продемонстрированная в таблице, существенно отличается от предыдущей, поскольку снижение pH питательной среды в кислую сторону при наличии сорбента в количестве 2000 мкг/мл, угнетает результативность доксициклина. В нейтральной среде при концентрации сорбента от 2000 до 250 мкг/мл показатель угнетения роста кишечной палочки доксициклином достоверно не достигал его значения в контроле. Более низкие концентрации сорбента (от 125 до 3,91 мкг/мл) в большинстве случаев только приближали ингибирующую активность доксициклина к контрольному показателю. В щелочной среде (pH 8) исследуемые концентрации сорбента полностью подавляли антимикробное действие доксициклина.

Надо полагать, что предпосылками проявления снижения антибактериаль-

ной активности энрофлоксацина и доксициклина являлась повышенная диссоциация из монтмориллонит содержащего сорбента в питательную среду ионов алюминия, железа, магния, кальция, натрия, в силу чего с данными препаратами образовывались неактивные хелатные соединения [11].

Лишь при весьма незначительных концентрациях сорбента 7,81-3,91 (pH питательной среды 6); 62,50-3,91 (pH питательной среды 7) и 31,25-3,91 мкг/мл (pH питательной среды 8) чётко фиксировался потенцирующийся эффект энрофлоксацина. Идентичная результативность отмечалась и у доксициклина, если в кислой питательной среде содержание сорбента не превышало 1000 мкг/мл.

Объяснением установленной повышенной потенцирующей эффективности препаратов, по-видимому, является процесс иммобилизации на их поверхности активных лигандов.

В ходе анализа флуоресцентных изображений было установлено, что наибольшее количество живых бактерий (196,67±8,16) отмечалось в пробе V, а полное отсутствие живых кишечных палочек обнаружено в пробе I. Выявлено недостоверное различие содержания жизнеспособных клеток эшерихий в пробах IV (31,0±15,34) и II (35,83±12,45), что свидетельствует об отсутствии бактерицидных и ростостимулирующих свойств у обогащённого монтмориллонит содержащего сорбента. Наряду с этим недостоверные различия отмечаются между пробой IV (31,0±15,34) и пробой III (22,17±4,49), что указывает на снижение бактерицидной эффективности сочетанного применения энрофлоксацина с сорбентом. Достоверное различие ($p<0,05$) между пробами II и III подтверждает возможность частичного связывания энрофлоксацина монтмориллонит содержащим сорбентом.

Флуоресцентная микроскопия проб, содержащих сорбент, подтверждает факт сорбции *Escherichia coli* монтмориллонит содержащим сорбентом. Кроме того, ни одной кишечной палочки, флуоресцирующей светло-зелёным свечением, не располагалось обособлено от частиц сорбента (рис. 1-2).

Таким образом, по итогам конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, было установлено, что сорбент на основе монтмориллонитовой глины не обладает бактерицидными и ростостимулирующими свойствами по отношению к *Escherichia coli*, при этом сорбент эффективно аккумулирует на поверхность частиц живые бактерии *E. coli*. Однако, при совместном применении сорбента и энрофлоксацина, бактерицидная эффективность последнего по отношению к *E. coli* снижается.

Выводы

Резюмируя выше приведенные материалы можно отметить, что создание новых препаратов расширяет возможности применения энтеросорбции в комплексном лечении животных, страдающих острыми кишечными заболевании инфекционной этиологии. В целом разработка отечественных композиционных антимикробных препаратов на основе обогащённого

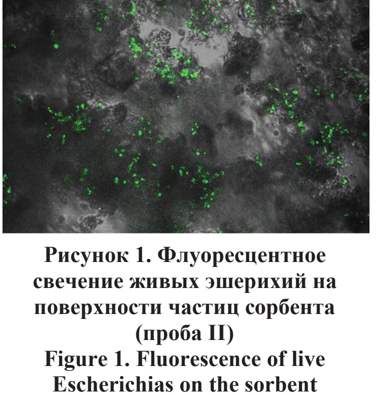

Рисунок 1. Флуоресцентное свечение живых эшерихий на поверхности частиц сорбента (проба II)
Figure 1. Fluorescence of live Escherichias on the sorbent particles (sample II)

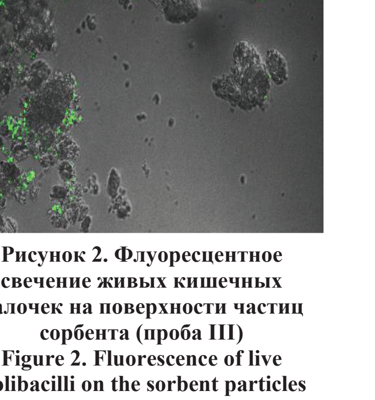

Рисунок 2. Флуоресцентное свечение живых кишечных палочек на поверхности частиц сорбента (проба III)
Figure 2. Fluorescence of live Colibacilli on the sorbent particles (sample III)

монтмориллонит содержащего сорбента позволяет шире задействовать эффективные здоровьесберегающие и независимые от импорта технологии для профилактики и лечения многих патологий. Кроме того, рациональное использование композиционных антимикробных препаратов можно применить для дозированного введения лекарственных соединений при условии их обратной десорбции.

Создание препаратов указанного направления связано, как с использованием селективных энтеросорбентов с заведомо известной химической природой их поверхности и размером пор, так и особенностями терапевтического действия в различных отделах желудочно-кишечного тракта с учётом pH химуса и необходимой концентрации сорбента.

Придание энтеросорбентам специфических свойств путём иммобилизация на их поверхности лекарственных субстанций в виде активных лигандов, является перспективным направлением, позволяющим оптимизировать и минимизировать расход антибактериального средства и, в ряде случаев, повысить его удельную активность за счёт перехода от объемных концентраций к поверхностным. Решение сложившейся проблемы подобным образом снижает или даже устраняет негативное воздействие на организм химиотерапевтических субстанций. Использование такого подхода даёт возможность, на основе уже существующих препаратов, достаточно быстро получить профилактические и лечебные комплексные соединения с повышенной эффективностью.

Библиографический список:

1. Захаров П. Г. Как сохранить новорожденных телят // Практические рекомендации. СПб.: ГИОРД, 1998. – с. 12-30.
2. Vidotto M. C., Navarro H. R., Gaziri L. C. Aderence pili of patogenic strains of avian E. coli// Veter. Microbiol, vol. 59, № 1, 1997. – p. 79-87.
3. Беднягин В. Е. Атипичная форма колибактериоза поросят Автореф. Дис. канд. вет. наук / Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина. М., 2000. – 16 с.
4. Макаров В. В. Синантропизация, ветеринарная эпидемиология и зоонозы // Ветеринарная Патология. - № 4 (38). - 2011. – с. 7-18.
5. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках: учебное пособие для студентов биологических специальностей университетов. М.: Высшая школа. – 1979. – 456 с.
6. Тараканов Б. Г. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных // Ветеринария. - №1. - 2000. – с. 47-54.
7. Лопаткин Н.А., Лопухин Ю.М. Эфферентные методы в медицине (теоретические и клинические аспекты экстракорпоральных методов лечения). – М.: Мед. – 1989. – 352 с.
8. Бородин Ю.И., Любарский М.С., Летягин А.Ю. и др. Сорбционно-аппликационные и лимфотропные методы в комплексном лечении ожогов. Новосибирск: СибВО, 1995. - 142 с.
9. Коптев В. Ю. Лабораторные и клинические испытания нового энтеросорбента ЭСТ-1 Электронный ресурс. / Коптев В.Ю. // Электрон, ст. Режим доступа к ст.: http: // laboratorium.narod.ru/estl.htm.
10. Учайкин В. Ф., Новокшонов А. А., Соколова Н. В., Бережкова Т. В. Энтеросорбция – роль энтеросорбентов в комплексной терапии острой и хронической гастроэнтерологической патологии // Пособие для врачей. М. – 2008. – 24 с.
11. Доксициклин // Материал из Википедии – свободной энциклопедии // Электрон, ст. Режим доступа к ст.: http: // ru.wikipedia.org / wiki /
12. Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии – СПб: ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.
13. Zotta T., Guidone A., Tremonte P., Parente E., Ricciardi A. A comparison of fluorescent stains for the assessment of viability and metabolic activity of lactic acid bacteria // World Journal of Microbiology and Biotechnology March 2012, Vol. 28. – p. 919-927.

References:

1. Zaharov P. G. Kak sohranit› novorozhdennyh teljat [How to keep newborn calves] // Prakticheskie rekomendacii. SPb.: GIORD, 1998. – s. 12-30.
2. Vide supra.
3. Bednjagin V. E. Atipichnaja forma kolibakterioza porosjat [Atypical form of colibacillosis of piglets] Avtoref. Dis. kand. vet. nauk / Moskovskaja gosudarstvennaja akademija veterinarnoj mediciny i biotehnologii im. K.I.Skrjabina. M. - 2000. – 16 s.
4. Makarov V. V. Sinantropizacija, veterinarnaja jepidemiologija i zoonozy [Synanthropization, veterinary epidemiology and zoonoses] // Veterinarnaja Patologija. - № 4 (38). - 2011. – s. 7-18.
5. Egorov N. S. Osnovy uchenija ob antibiotikah: uchebnoe posobie dlja studentov biologicheskih special›nostej universitetov [Basic teachings about antibiotics: a textbook for students of biology majors universities]. M.: Vysshaja shkola, 1979. – 456 s.
6. Tarakanov B. G. Mehanizmy dejstvija probiotikov na mikrofloru pishhevaritel›nogo trakta i organizm zhivotnyh [Mechanisms of action of probiotics on the microflora of the digestive tract and the body of animals] // Veterinarija. - №1. - 2000. – s. 47-54.
7. Lopatkin N.A., Lopuhin Ju.M. Jefferentnye metody v medicine (teoreti- cheskie i klinicheskie aspekty jekstrakorporal›nyh metodov lechenija) [Efferent methods in medicine (theoretical and clinical aspects of extracorporeal therapies)]. – M.: Med. – 1989. – 352 s.
8. Borodin Ju.I., Ljubarskij M.S., Letjagin A.Ju. i dr. Sorbcionno-applikacionnye i limfotropnye metody v kompleksnom lechenii ozhogov [Sorption-lymphotropic intraoral and methods in treatment of burns]. Novosibirsk: SibVO, 1995. - 142 s.
9. Koptev V. Ju. Laboratornye i klinicheskie ispytanija novogo jenterosorbenta JeST-1 Jelektronnyj resurs [Laboratory and clinical tests of new enterosorbent EST-1 Electronic resource.] / Koptev V.Ju. // Jelektron, st. Rezhim dostupa k st.: http: // laboratorium.narod.ru/estl.htm.
10. Uchajkin V. F., Novokshonov A. A., Sokolova N. V., Berezhkova T. V. Jenterosorbcija – rol›

jenterosorbentov v kompleksnoj terapii ostroj i hronicheskoj gastrojenterologicheskoj patologii [Enterosorption - enterosorbents role in the complex treatment of acute and chronic gastroenterological diseases] // Posobie dlja vrachej. M., 2008. – 24 s.
11. Doksiciklin [Doxycycline]// Material iz Vikipedii – svobodnoj jenciklopedii // Jelektron, st. Rezhim dostupa k st.: http: // ru.wikipedia.org / wiki /
12. Shtejn G.I. Rukovodstvo po konfokal›noj mikroskopii [Guidelines for confocal microscopy] – SPb: INC RAN, 2007. – 77 s.
13. Vide supra.

N. P.Zuev, V.D. Buhanov, A.I. Vezentsev, Nguen Hoai Chau, B.N. Skvortsov, A.A.Shaposhnikov, O.N. Pankova, S.N. Zuev, P.V. Sokolovskiy, E.N. Zueva,L.A. Kozubova

INFLUENCE OF MONTMORILLONITE-CONTAINING SORBENT AND PH OF NUTRIENT MEDIUM ON *ESCHERICHIA COLI'S* SENSITIVITY TOWARDS ANTIBACTERIAL PREPARATIONS

Key Words: colibacillosis, sensitivity test, *Escherichia coli*, nutrient media, Enrofloxacin, Doxycycline, montmorillonite-containing sorbent, compositional preparations, confocal scanning laser microscopy.

Abstract: The study allowed establishing antibacterial activity of Enrofloxacin and its combinations with enriched montmorillonite-containing sorbent towards colibacillus. The results of the study demonstrate high sensitivity of colibacillus towards a compositional preparation consisting of Enrofloxacin with sorbent mix in 1:1 ratio, with each preparation featuring concentration of 0.063 μkg/ml of broth. It was found that sorption activity of enriched montmorillonite-containing clay towards organic compounds is higher in acid environment than in alkaline one. Nutrient media pH and amount of sorbent in it has similar impact decreasing bacteriostatic activity of Doxycycline. Prerequisites for lowering antibacterial activity of Enrofloxacin and Doxycycline is enhanced dissociation from isomontmorillonite-containing sorbent ions of aluminum, iron, calcium, and sodium into the nutrient media, resulting in formation of inactive chelate compounds with the active preparations [11]. Increased potentiating effect of the preparations is apparently provided by immobilization of their molecules on the surface of active ligands. Summarizing the data above, it is safe to assume that creation of new preparations expands possible application of enterosorption in complex animal treatment against acute intestinal diseases of infectious origin. Moreover, rational application of compositional antimicrobial preparations may be utilized for dosing of medications on account of their desorption capability. Creation of preparations with such properties is associated with both selective enterosorbents with known surface chemical properties and pore size, and specifics of therapeutic activity in different sections of gastrointestinal tract with respect to chime pH and required sorbent concentration. Attribution of specific properties to enterosorbents through surface immobilization of medical agents in form of active ligands is a promising way of development allowing optimizing and minimizing antibacterial preparation and, in many cases, to enhance its specific activity by shifting from volume concentrations to surface ones. Such solution also decreases or even eliminates negative impact of chemotherapeutical substances on the organism.

Сведения об авторах:

Зуев Николай Петрович, д.в.н., проф. кафедры незаразной патологии факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО «Белгородская ГСХА имени В.Я.Горина»; e-mail: zuev1960nikolai@mail.ru, тел. 8-904-082-46-83.

Буханов Владимир Дмитриевич, к.в.н., доцент кафедры медико-биологических основ физической культуры Белгородского государственного национального исследовательского университета; e-mail: valabu55@bk.ru.

Везенцев Александр Иванович, д.т.н., проф., зав. кафедрой общей химии Белгородского государственного национального исследовательского университета; e-mail: vesentsev@bsu.edu.ru, тел. 30 – 11 – 50.

Нгуен Хоай Тьяу, д.ф.-м.н., проф., директор института экологических технологий Академии наук и технологий Вьетнама; nhchau.iet@gmail.com.

Скворцов Владимир Николаевич, д.в.н., зав. Белгородским филиалом Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко; e-mail: valabu55@bk.ru, тел.: 8 (4722) 26– 29 – 75.

Шапошников Андрей Александрович, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биохимии и фармакологии Белгородского государственного национального исследовательского университета; e-mail: shaposhnikov@bsu.edu.ru, тел.: 8 (4722) 30 – 14 – 11.

Панькова Ольга Николаевна, н.с. Белгородского филиала государственного научного учреждения всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной

ветеринарии им. Я.Р. Коваленко; e-mail: valabu55@bk.ru, тел.: 8 (4722) 26– 29 – 75.

Соколовский Павел Викторович, аспирант кафедры общей химии Белгородского государственного национального исследовательского университета; e-mail: levap90@list.ru, тел. 8 – 904 - 534 – 67 – 01.

Козубова Лариса Алексеевна, к.б.н., доцент кафедры фармакологических технологий, управления, экономики, здравоохранения Белгородского государственного национального исследовательского университета; e-mail: kozubova@bsu.edu.ru, тел.: 8 – 920 - 202 – 25 – 92.

Зуева Екатерина Николаевна, студентка факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО «Белгородская ГСХА имени В.Я.Горина; zuev1960nikolai@mail.ru, тел. 89507112314.

Зуев Сергей Николаевич, аспирант кафедры морфологии и физиологии ФГБОУ ВПО «Белгородская ГСХА имени В.Я.Горина»; zuev1960nikolai@mail.ru, тел. 8-920-571-70-53.

Author affiliation:

Zuev Nikolai Petrovich, D.Sc. in Veterinary Medicine, Prof., Department of noncommunicable pathology, faculty of veterinary medicine, FSEI HPE «Belgorod state agricultural Academy of a name of V.Ya.Gorina»; e-mail: zuev_1960_nikolai@mail.ru, tel.8-904-082-46-83.

Buhanov Vladimir Dmitrievich, Ph. D. in Veterinary Medicine, Assoc. Prof. of medical and biological bases of physical education National Research Belgorod State University; e-mail: valabu55@bk.ru, phone: 8 (4722) 30 - 11 – 50

Vezentsev Alexander Ivanovich, D. Sc. in technical, Prof., head of the department of general chemistry, National Research Belgorod State University; e-mail: vesentsev@bsu.edu.ru, phone: 8 (4722) 30 - 11 – 50.

Nguen Hoai Chao, D. Sc. in physico-mathematical, Prof., director of the Institute for Environmental Technology Academy of Science and Technology of Vietnam; e-mail: nhchau.iet@gmail.com.

Nadezhdin Sergey Viktorovich, Ph. D. in Biology, Assoc. Prof. of the department of anatomy and physiology of living organisms, National Research Belgorod State University; e-mail: nadezhdin@bsu.edu.ru, phone: 8 (4722) 30 – 11 – 59.

Skvortsov Vladimir Nikolaevich, D.Sc. in Veterinary Medicine, head of the Belgorod branch of the Department of Belgorod State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Experimental veterinary named Y.R. Kovalenko; e-mail: valabu55@bk.ru.e-mail: phone: 8 (4722) 26 – 29 – 75.

Shaposhnikov Andrei Alexandrovich, D. Sc. in Biology, Prof., head of the department of biochemistry and pharmacology, National Research Belgorod State University; e-mail: shaposhnikov@bsu.edu.ru, phone: 8 (4722) 30 - 14 – 11.

Pankov Olga Nikolaevna, a researcher at the Department of Belgorod State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Experimental veterinary named Y.R. Kovalenko; e-mail: valabu55@bk.ru, phone: 8 (4722) 30 - 11 - 50.

Sokolovskiy Pavel Viktorovich, graduate student, department of general chemistry, National Research Belgorod State University; e-mail: levap90@list.ru, phone: 8 - 904 - 534 - 67 – 01.

Kozubova Larisa Alekseevna, Ph. D. in Technical, Assoc. Prof. of pharmaceutical technology, management, economics, health, Belgorod State National Research University; e-mail: kozubova@bsu.edu.ru, phone: 8 - 920 - 202 - 25 – 92.

Zueva Catherine Nikolaevna, student of faculty of veterinary medicine of FSEI HPE «Belgorod state agricultural Academy of a name of V.Ya.Gorina»; e-mail: zuev_1960_nikolai@mail.ru, phone: 89507112314.

Zuev Sergey Nikolaevich, PhD student of department of morphology and physiology FSEI HPE «Belgorod state agricultural Academy of a name of V.Ya.Gorina»; e-mail: zuev_1960_nikolai@mail.ru, phone:. 8-920-571-70-53.